

响应面法优化谷氨酸亚铁的制备工艺

黄 杰, 于 新*, 刁丽婷, 黄晓敏

(仲恺农业工程学院轻工食品学院, 广东 广州 510225)

摘 要:以氯化亚铁和谷氨酸钠为原料,在单因素试验的基础上,利用响应面分析法优化谷氨酸亚铁的固液相法制备工艺条件,选定介质pH值、反应温度和反应时间,通过中心组合试验,建立二次回归方程。结果表明,反应物质的量比、介质pH值、反应时间及温度对反应产物产率均有一定的影响。优化的制备工艺条件为谷氨酸与 Fe^{2+} 物质的量比1:1、介质pH 5.76、反应时间0.75 h、反应温度58.9 °C,产率为77.79%。反应产物谷氨酸亚铁螯合物的组成为 $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_7\text{NO}_4) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 。

关键词:谷氨酸亚铁;响应面分析;食品添加剂;制备工艺;优化

Optimization of the Preparation Process of Ferrous Glutamate by Response Surface Methodology

HUANG Jie, YU Xin*, DIAO Liting, HUANG Xiaomin

(College of Light Industry and Food Science, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China)

Abstract: Ferrous glutamate was prepared from ferrous chloride and sodium glutamate by a solid-liquid phase method. The preparation process was optimized using combination of single factor method and response surface methodology. A quadratic regression model indicating the effect of three variables including medium pH, reaction temperature and time on ferrous glutamate yield was established using a central composite design. The results showed that the optimal conditions for preparing ferrous glutamate were determined as follows: molar ratio of $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$ to Fe^{2+} , 1:1; medium pH, 5.76; reaction temperature, 58.9 °C; and reaction time, 0.75 h. Under these conditions, the yield of ferrous glutamate was 77.79%. The chemical formula of the ferrous glutamate was $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_7\text{NO}_4) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Key words: ferrous glutamate; response surface methodology; food additive; preparation process; optimization

中图分类号: O614.81

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2015) 10-0081-05

doi:10.7506/spkx1002-6630-201510016

铁是人体必需的微量元素之一^[1],是血红素、肌蛋白和细胞色素的重要组成部分和氧化还原酶的激活剂,铁在人体中分布很广。膳食中若长期缺铁或铁吸收障碍,可引起缺铁性贫血,影响红细胞的代谢,降低人体免疫功能,并对青少年儿童的生长发育造成严重影响,铁代谢的重要性已远远超过红细胞和血红蛋白的范围^[2-3]。

食品与营养科学的研究表明,微量元素添加剂——氨基酸螯合物具有化学性能稳定、生物效价高、无毒无刺激性、适口性好、补充人体必须微量元素、增强人体免疫功能、提高人体抗应激能力等特性^[4]。因此,氨基酸螯合物成为目前国际公认的最佳微量元素营养强化剂或添加剂。随着乳铁蛋白抑菌功能的发现及其应用技术的研究,人们利用动植物蛋白资源开发复合蛋白氨基酸亚铁,但是纯化的蛋白质使用成本高,且蛋白质与亚铁的螯合率不高,产品质量检验方法与检验指标尚未完善。甘氨酸作为结构最简单的氨基酸,其与 Fe^{2+} 的反应得到

了广泛研究^[5]。张大飞等^[6]以甘氨酸和硫酸亚铁铵为原料,采用熔融法合成甘氨酸亚铁络合物,确定其化学式为 $(\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COO})_2\text{Fe} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$;李大光等^[7]以氯化亚铁和甘氨酸为原料,利用一步室温固相反应合成了一水合甘氨酸亚铁;俞露等^[8]以甘氨酸与碳酸亚铁为原料,固液相法合成了阴离子干扰少、纯度较高的甘氨酸亚铁螯合物,判断甘氨酸亚铁是带10个结晶水的反式结构螯合物。作为体内代谢的基本氨基酸之一的酸性氨基酸——谷氨酸^[9-11],其与亚铁盐的螯合物研究未见报道。

味精即谷氨酸钠作为调味品或食品添加剂在中国、美国、英国、日本等国家已经食用100多年,能够显著增加食品的鲜味,并且是安全的。但是,在使用味精调味的同时,增加了 Na^+ 食用量,容易出现口渴、嗜睡的生理现象^[12]。*L*-谷氨酸属“非必需”,在人体内可由 α -酮戊二酸产生。*L*-谷氨酸是一种氨基酸类药物,用于肝昏迷、癫痫预防、减轻酮尿症和酮血症等,亦是一种脑营

收稿日期: 2014-09-29

作者简介: 黄杰(1989—),男,硕士研究生,研究方向为食品添加剂。E-mail: lawrence0817@163.com

*通信作者: 于新(1959—),男,教授,硕士,研究方向为农产品贮藏与加工。E-mail: yuxin1959@aliyun.com

养剂,也可作肝脏药物谷胱甘肽的生产原料^[13]。以其制备谷氨酸亚铁,兼具调味、补充营养和预防缺铁性贫血症的作用。

本实验以氯化亚铁和谷氨酸钠为主要原料,通过控制反应条件和降低产物在有机溶剂中的溶解度,探寻制备谷氨酸亚铁的工艺。根据多元回归分析多个独立变量及其交互关系对依变量的影响^[14],应用响应面法优化谷氨酸亚铁的制备工艺,旨在对谷氨酸亚铁的深入研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

碳酸钠、氯化亚铁、铁粉、氢氧化钠(均为分析纯) 天津市福晨化学试剂厂;乙醇(分析纯) 天津市富宇精细化工有限公司;盐酸(分析纯) 广州化学试剂二厂;谷氨酸钠 河南莲花味精股份有限公司。

1.2 仪器与设备

UV1800紫外光谱仪 日本岛津公司;PerkinElmer Spectrum 100(84544)傅里叶变换红外光谱仪 美国珀金埃尔默公司;HCT-1型微机差热天平 北京恒久科学仪器厂。

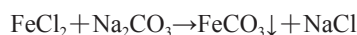
1.3 方法

1.3.1 谷氨酸亚铁的制备

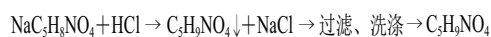
将一定量的碳酸钠和氯化亚铁分别溶于适量去离子水,搅拌,将碳酸钠溶液缓慢加入氯化亚铁溶液中,充分反应。静置,过滤,用蒸馏水洗涤沉淀物,直至无氯离子检出为止。

将一定量的谷氨酸钠溶于适量去离子水,用0.05 mol/L盐酸调至pH 3.22,使其发生沉淀,静置过滤,得谷氨酸。将新制得的碳酸亚铁倾入谷氨酸的热水溶液中,同时加入铁粉,调至pH 4.0~5.0。加热搅拌,80℃恒温反应60 min。过滤,滤液浓缩,加入适量无水乙醇使沉淀析出^[15]。抽滤,洗涤,真空干燥,称量,得产物谷氨酸亚铁。

其反应式为:



工艺流程如下所示:



↓ + 铁粉

FeCl_2 、 Na_2CO_3 → 反应 → 静置 → 过滤 → 洗涤 → FeCO_3 → 反应 → 过滤 → 浓缩 → 沉淀 → 抽滤 → 洗涤 → 干燥 → 产品

$$\text{产率}/\% = \frac{\text{实际产物的质量}/\text{g}}{\text{理论产物的质量}/\text{g}} \times 100$$

1.3.2 单因素试验

1.3.2.1 介质pH值对产率的影响

选取pH值范围4~7、投料物质的量比1:1、反应温度60℃、反应时间1.0 h。以反应产物产率为评价指标,考察介质pH值对谷氨酸亚铁制备的影响。

1.3.2.2 反应温度对产率的影响

选取反应温度范围30~90℃、介质pH 6、投料物质的量比1:1、反应时间1.0 h。以反应产物产率为评价指标,考察反应温度对谷氨酸亚铁制备的影响。

1.3.2.3 反应时间对产率的影响

选取反应时间范围0.5~3 h、介质pH 6、投料物质的量比1:1、反应温度60℃。以反应产物产率为评价指标,考察反应时间对谷氨酸亚铁制备的影响。

1.3.2.4 投料物质的量比对产率的影响

选取谷氨酸与 Fe^{2+} 物质的量比范围1:1~3:1、介质pH 6、反应温度60℃、反应时间1.0 h。以反应产物产率为评价指标,考察投料物质的量比对谷氨酸亚铁制备的影响。

1.3.3 响应面试验

根据单因素试验结果设定因素水平,采用Design-Expert 8.05b软件设计响应面试验方案,以反应产物产率为响应值,优化谷氨酸亚铁的制备工艺条件。

1.3.4 产物的鉴定方法

真空干燥产物,定量测定产物结晶水数目;紫外-可见分光光度法、红外光谱法配合确定螯合物是否生成^[16-18];示差扫描量热(differential scanning calorimeter, DSC)法分析测定螯合物结晶水分解温度、螯合物的熔点。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 介质pH值对谷氨酸亚铁产率的影响

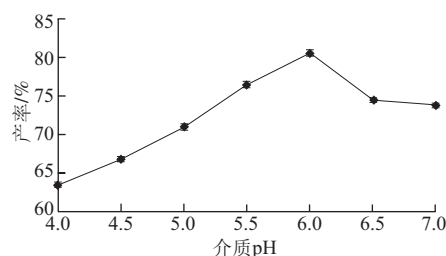


图1 介质pH值对谷氨酸亚铁产率的影响

Fig.1 Effect of medium pH on the yield of ferrous glutamate

谷氨酸和 Fe^{2+} 的配位反应与介质pH值有密切关系。谷氨酸的等电点3.22,在pH值小于4的酸性条件下, H^+ 与 Fe^{2+} 争夺供电子基团, H^+ 易与谷氨酸根离子结合生成谷氨酸,从而不利于谷氨酸亚铁螯合物的形成;在pH值

大于7的碱性条件下, Fe^{2+} 易氧化水解, 生成 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 沉淀。因此, 本试验选取 pH 4~7 范围进行考察。由图1可见, 在 pH 4~7 范围内均可生成谷氨酸亚铁, pH 值对产物的配位比影响不大, 但对产率有较大的影响。pH 值不大于6时, 产物产率随着介质 pH 值的升高而增大; pH 值不小于6时, 产物产率逐渐减小。依据试验结果, 选择 pH 6.0 设计响应面试验。

2.1.2 反应温度对谷氨酸亚铁产率的影响

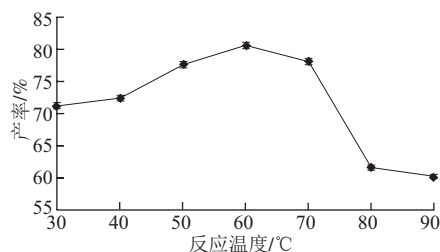


图2 反应温度对谷氨酸亚铁产率的影响

Fig.2 Effect of temperature on the yield of ferrous glutamate

反应温度对谷氨酸和 Fe^{2+} 的配位反应有影响。升高温度可以加快反应速率, 但促进 Fe^{2+} 水解, 生成 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 沉淀, 且影响产物的稳定性。在 30~60 °C 范围内, 随反应温度升高, 产物产率增加; 温度大于 60 °C, 产物产率明显降低 (图2)。螯合反应是一个放热反应^[19], 升温虽然可加快反应速率, 但抑制正反应的进行。选择温度 60 °C 设计响应面试验。

2.1.3 反应时间对谷氨酸亚铁产率的影响

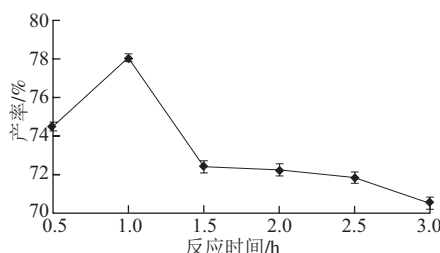


图3 反应时间对谷氨酸亚铁产率的影响

Fig.3 Effect of reaction time on the yield of ferrous glutamate

碳酸钠和氯化亚铁的反应为复分解反应, 反应速率快, 因此在制备碳酸亚铁过程中, 缓慢搅拌加入碳酸钠溶液, 反应 15~30 min 即可。如图3所示, 碳酸亚铁与谷氨酸的反应时间达到 1 h 时产率较高。此后, 由于 Fe^{2+} 在空气中易被氧化, 随反应时间延长, 产物产率降低。因此选用反应时间 1.0 h 设计响应面试验。

2.1.4 投料物质的量比对谷氨酸亚铁制备的影响

配位比即配体与金属离子的物质的量之比^[20], 它是影响金属离子与氨基酸配位反应的一个重要因素, 配位比对反应产物的产率、产物中 Fe^{2+} 的含量 (质量分数)

有较大影响。碳酸钠与氯化亚铁按 1:1 的物质的量比投料进行反应, 防止任何一种物质过量而影响碳酸亚铁的纯度。

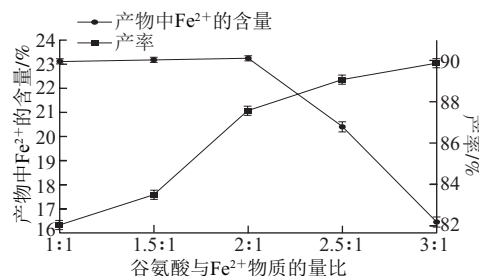


图4 投料物质的量比对谷氨酸亚铁制备的影响

Fig.4 Effect of molar ratio of glutamate to Fe^{2+} on the yield of ferrous glutamate

由图4可知, 在物质的量比为 1:1~2:1 时, 随谷氨酸量的增加, 产物产率随之增加, Fe^{2+} 含量有增加的趋势, 但不明显。谷氨酸和 Fe^{2+} 物质的量比为 2:1 时, 产物中 Fe^{2+} 含量达到最高。当物质的量比大于 2:1, Fe^{2+} 含量有所降低, 而产率继续增加, 但增幅减小。这是因为增加谷氨酸物质的量, 促进反应正向进行, 使产率增大, 但同时也会增加产物中游离谷氨酸的含量, 使亚铁的含量降低。综合考虑, 选取 1:1 作为谷氨酸与 Fe^{2+} 制备谷氨酸亚铁配合物的最佳物质的量比, 用在响应面试验中。

2.2 产物鉴定

2.2.1 产物的物理性质

墨绿色粉末, 不透明, 鲜味突出, 溶于水。取 2 g 样品, 160 °C 真空干燥至质量恒定, 失质量 0.30 g, 占 15%, 与失去两分子结晶水的理论值相当, 即该化合物带两个结晶水, 符合化学式 $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_7\text{NO}_4) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 。

2.2.2 紫外光谱分析

分别配制 1.0% 的谷氨酸、谷氨酸亚铁溶液, 在 200~600 nm 波长范围测其吸收光谱。

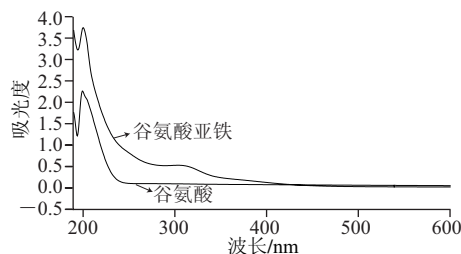


图5 谷氨酸及谷氨酸亚铁紫外吸收光谱

Fig.5 UV spectra of glutamic acid and ferrous glutamate

由图5可知, 谷氨酸远紫外区最大吸收峰位于 205 nm 波长处, 谷氨酸亚铁位于 214 nm 波长处, 向长波方向移动 9 nm。相同质量分数时, 谷氨酸亚铁最大吸收峰高度比谷氨酸有明显的增高, 且在 303 nm 波长附近有一宽肩

峰。符合金属氨基酸螯合物的生成会使其近紫外吸收峰发生红移一般规律。由此可证明谷氨酸亚铁螯合物的生成。这与已有研究^[21-22]中酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、甘氨酸、赖氨酸的铜、锌螯合物的紫外吸收峰红移具有类似结果。

2.2.3 红外光谱分析

KBr压片法测定谷氨酸和谷氨酸亚铁在400~4 000 cm⁻¹的红外光谱。

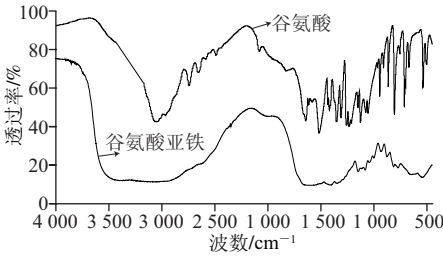


图6 谷氨酸及谷氨酸亚铁的红外光谱图

Fig.6 Infrared spectra of glutamic acid and ferrous glutamate

从图6可知,谷氨酸与Fe²⁺形成螯合物后,其主要吸收峰数量、峰形、波数、强度与配体相比发生了明显变化。谷氨酸在3 650~3 200 cm⁻¹间出现游离O—H基的伸缩振动吸收,羟基浓度高,形成氢键的能力更强,发生缔合现象,O—H基伸缩振动吸收峰向低波数方向位移,在3 100~2 900 cm⁻¹出现一个强吸收峰,峰形尖锐,而谷氨酸亚铁则是在3 100~3 500 cm⁻¹间有一较宽的强吸收峰,较谷氨酸配体向高波数移动,表明谷氨酸亚铁中游离O—H基浓度低,不存在分子间的缔合作用,O—H基与Fe²⁺发生了反应。谷氨酸在3 069 cm⁻¹处的N—H键伸缩振动的特征吸收峰,在形成配合物后发生了位移,且在1 500 cm⁻¹附近无NH₃⁺的弯曲振动峰。在540 cm⁻¹处出现了Fe—N的伸缩振动峰^[23],说明α-氨基N原子参与了配位。在1 619 cm⁻¹和1 406 cm⁻¹出现的吸收峰分别是COO⁻的反对称和对称伸缩振动峰,较配体向高波数移动(谷氨酸的COO⁻的反对称伸缩振动和对称伸缩振动为1 517 cm⁻¹和1 311 cm⁻¹),表明C₁羧基是以单齿方式配位。配合物中仍有羧基的特征峰(3 375 cm⁻¹左右),表明谷氨酸中C₅羧基未参与配位^[24-25]。

2.2.4 DSC分析

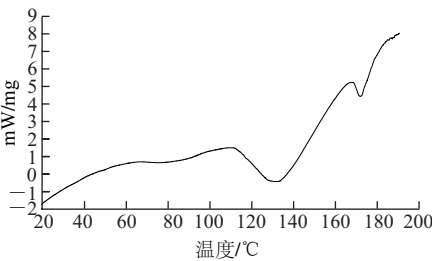


图7 谷氨酸亚铁的DSC分析图谱

Fig.7 DSC analysis of ferrous glutamate

取5 mg样品,在HCT-1型微机差热天平上以α-Al₂O₃为参比在氮气气氛中进行测试,升温速率20 °C/min,温度范围20~200 °C。从图7可看到,DSC曲线在132 °C有一吸热峰,说明螯合物结晶水受热分解,DSC曲线在171.9 °C有一吸热峰,螯合物在此温度左右开始熔化,慢慢发生分解。

2.3 响应面试验结果

2.3.1 模型的建立及显著性检验

依据单因素试验结果,确定各因素水平取值。采用Design-Expert 8.05b软件设计响应面试验方案(表1),根据试验结果得到数学模型为:

$$Y = -136.3 + 42.58A + 3.042B + 4.307C - 0.192 AB + 0.220 AC - 0.056 BC - 2.726A^2 - 0.016 B^2 - 1.526C^2$$

表1 响应面试验方案及结果

Table 1 Box-Behnken experimental design with predicted and experimental yields of ferrous glutamate

试验号	A 介质pH	B 反应温度/°C	C 反应时间/h	产率/%	
				试验值	预测值
1	6.5	65	1.0	74.53	74.57
2	5.5	65	1.0	77.03	76.96
3	6.0	60	1.0	76.95	77.32
4	6.5	55	1.0	76.40	76.47
5	6.0	60	1.0	77.50	77.32
6	5.5	60	1.5	76.53	76.52
7	6.0	60	1.0	77.02	77.32
8	6.5	60	1.5	75.32	75.20
9	6.5	60	0.5	75.87	75.88
10	6.0	60	1.0	77.20	77.32
11	6.0	65	0.5	76.65	76.60
12	6.0	60	1.0	77.92	77.32
13	6.0	55	1.5	76.70	76.75
14	5.5	55	1.0	76.98	76.94
15	6.0	55	0.5	77.33	77.25
16	5.5	60	0.5	77.30	77.42
17	6.0	65	1.5	75.46	75.53

表2 回归模型方差分析

Table 2 Analysis of variance (ANOVA) for the regression model

来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	11.67	9	1.30	13.15	0.001 3*
A 介质pH	4.09	1	4.09	41.47	0.000 4*
B 反应温度	1.75	1	1.75	17.73	0.004 0*
C 反应时间	1.23	1	1.23	12.50	0.009 5*
AB	0.92	1	0.92	9.34	0.018 4*
AC	0.012	1	0.012	0.12	0.736 4
BC	0.078	1	0.078	0.79	0.402 2
A ²	1.96	1	1.96	19.83	0.003 0*
B ²	0.68	1	0.68	6.88	0.034 2*
C ²	0.61	1	0.61	6.21	0.041 4*
残差	0.69	7	0.099		
失拟项	0.057	3	0.019	0.12	0.944 1
纯误差	0.63	4	0.16		
总误差	12.36	16			

$$CV=0.41\% \quad R^2=0.944 \ 2$$

注:*.差异显著, P<0.05。

根据表2方差分析, 数学模型 $P=0.0013 < 0.05$, 说明该模型显著; 失拟项 $P=0.9441 > 0.05$ 不显著, $R^2=0.9442$, 变异系数0.41%, 说明该数学模型对试验拟合较好, 试验误差小, 可以用来预测试验结果。3个因素对试验结果均有一定的影响, 各个因素对谷氨酸亚铁的制备工艺条件影响的次序由大到小依次为: $A > B > C$, 即介质pH值 > 反应温度 > 反应时间; 因素间的交互作用 AB 对试验结果也有一定的影响^[26-27]。

2.3.2 验证实验结果

根据所建立的数学模型, 得到响应值最大时的优化条件: 介质pH 5.76、反应温度58.9℃、反应时间0.75 h。按照此条件重复3次实验, 产率分别为78.1%、77.61%、77.68%, 回归方程所得的预测值77.64%与验证实验的平均值77.79%相差不大, 因此, 谷氨酸亚铁的最佳制备工艺条件为: 介质pH 5.76、反应温度58.9℃、反应时间0.75 h、投料物质的量比1:1。

3 结 论

本实验以氯化亚铁和谷氨酸钠为主要原料, 通过固液相反应法制得阴离子干扰少、稳定性好的谷氨酸亚铁。通过响应面法优化获得的较佳制备工艺条件为投料物质的量比1:1、介质pH 5.76、反应温度58.9℃、反应时间0.75 h, 产率为77.79%, 其组成为 $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_7\text{NO}_4) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 。该制备反应工艺简单, 原料成本较低, 易实现工业化生产。

参考文献:

- [1] 王夔. 生命科学中的微量元素: 下卷[M]. 北京: 中国计量出版社, 1992: 254.
- [2] 程义勇, 蒋与刚. 生物医学微量元素数据手册[M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1994: 226.
- [3] RANGANATHAN S. Trial of ferrous glycine sulphate in the fortification of common salt with iron[J]. Food Chemistry, 1996, 57(2): 311-315.
- [4] 钟国清. 第三代微量元素添加剂的研究进展[J]. 饲料工业, 1996, 17(2): 23-26.
- [5] FOX T E, EAGLES J, FAIR-WEATHER-TAIL S J. Bioavailability of iron glycine as a fortificant in infant foods[J]. American Society for Clinical Nutrition, 1998, 67(4): 664-668.
- [6] 张大飞, 照日格图, 乌云, 等. 熔融法合成甘氨酸亚铁络合物及表征[C]//中国化学会2008年中西部地区无机化学、化工学术交流会会议论文集. 北京: 中国化学会, 国家自然科学基金委员会, 2008: 4.
- [7] 李大光, 林娜妹, 舒绪刚. 室温固相法制备甘氨酸亚铁的工艺研究[J]. 食品工业科技, 2009, 30(10): 285-287.
- [8] 俞露, 崔艳丽, 管海跃, 等. 一水合甘氨酸亚铁螯合物的合成及其表征[J]. 浙江大学学报: 理学版, 2013, 40(3): 291-296.
- [9] GREERSTEIN J P. Chemistry of the amino acids: II [M]. New York: John Wiley and Sons, Inc., 1963: 2316-2324.
- [10] 翟立海. 两种D-型酸性氨基酸的制备研究[D]. 南京: 东南大学, 2006.
- [11] 杨雪梅, 邱鹏宇, 杨宜球, 等. 酸性氨基酸二甲酯盐酸盐的合成工艺研究[J]. 广州化工, 2014, 42(8): 41-43.
- [12] WALKER R, LUPIEN J R. The safety evaluation of monosodium glutamate[J]. Journal of Nutrition, 2000, 130(4): 1049S-1052S.
- [13] 欧阳平凯. 化工产品手册[M]. 5版. 北京: 化学工业出版社, 2008: 11-12.
- [14] JEONG G T, KIM D H, PARK D H. Response surface methodological approach for optimization of free fatty acid removal in feedstock[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2007, 137/138/139/140: 583-594.
- [15] 张晓鸣, 林萍, 黄玲, 等. 一种食品营养添加剂甘氨酸亚铁螯合物的制备方法: 中国, 1634872A[P]. 2005-07-06.
- [16] 达世禄, 李小佳, 王忠华. 氨基酸-铜配位化合物的紫外检测高效液相色谱研究 I. 氨基酸-铜配合物的紫外吸收光谱[J]. 分析化学, 1991(6): 700-703.
- [17] 杜俊, 李茂国, 高迎春, 等. $\text{Cu}(\text{II})$ - α -氨基酸配合物的紫外光谱性质及组成测定[J]. 光谱实验室, 2003, 20(3): 415-418.
- [18] 石秀敏. 几种过渡金属有机配位化合物的光谱研究[D]. 长春: 吉林大学, 2010.
- [19] 管海跃, 崔艳丽, 毛建卫. 一水合甘氨酸锌螯合物的合成及其表征[J]. 浙江大学学报: 理学版, 2008, 35(4): 442-447.
- [20] 武汉大学. 分析化学: 上册[M]. 5版. 北京: 高等教育出版社, 2006: 336.
- [21] 管海跃. 甘氨酸微量元素螯合物的合成与表征研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2007.
- [22] 刘飞飞, 李群, 于岚. Cu^{2+} -Lys螯合物的合成和表征[J]. 应用化工, 2009(11): 1631-1634.
- [23] 鲁晓芳, 俞火明. 硫酸蛋氨酸合锌工艺研究[J]. 湖南化工, 1997, 27(1): 28-31.
- [24] 潘国祥, 曹枫, 郑卫红, 等. 谷氨酸插层水滑石组装、包裹及缓释性能研究[J]. 矿物学报, 2012(3): 455-460.
- [25] 王卫东, 谭祥中, 尹华意, 等. 稀土(铈)-谷氨酸-邻菲罗啉三元配合物的光谱和电化学性质[J]. 光谱实验室, 2008, 25(2): 143-146.
- [26] SUMANT P, QASIM K B, RANI G. Optimization of alkaline protease production from *Bacillus* sp. by response surface methodology[J]. Current Microbiology, 2002, 44: 286-290.
- [27] 蒋雨, 陈安均, 于新, 等. 响应面法优化微波提取野菊花抑菌物质工艺[J]. 食品科学, 2010, 31(22): 59-63.